甘蔗耐寒相关 miRNAs 的生物信息学分析及其靶基因预测

朱鹏锦 *，宋奇琦，谭秦亮，程 琴，李佳慧，庞新华，周全光，吕 平，欧克纬，卢业飞，农泽梅，唐桓伟，龙盛风

（广西壮族自治区亚热带作物研究所，南宁 530001）

摘要：为了解不同基因型甘蔗(*Saccharum officinarum*)响应低温胁迫的分子机制，挖掘耐寒相关的 miRNA 及相关靶基因，该文以低温胁迫 4 ℃处理 24 h 后的 3 个不同耐寒性甘蔗品种的叶片为材料进行 Illumina HiSeqTM2000 高通量测序，构建 18 个低温胁迫前后 sRNA 文库。结果表明:(1)共获得分属于 84 个家族的已知 miRNA 322 个及预测得到 110 个新 miRNA，并在已知 miRNAs 中筛选出差异表达 miRNA100 个(61 个上调，39 个下调)，新 miRNA 中筛选出差异表达 miRNA37(15 个上调，22 个下调)。(2）利用 psRNATarget、TargetFinder 和 Tapirhybrid 软件对所获得的差异表达 miRNA 进行靶基因预测，预测得到 1844 个靶基因并进行 GO 分析揭示了这些靶基因的 3 个主要功能类别，即分子功能、细胞组分与生物过程。（3）为验证高通量测序数据的可靠性，筛选 14 个 miRNA 及其靶基因进行 qRT-PCR 验证，表明这些 miRNA 均被检测发现且大部表达结果与测序结果一致。(4）还鉴定出部分差异表达 miRNA 的靶基因，这些基因参与植物生长、发育及低温胁迫反应。综上结果表明，耐寒型甘蔗体内 miRNA 直接或者间接作用靶基因实现表达调控相关代谢途径，对其重要农艺性状均起着关键的调控作用。

关键字：甘蔗，低温胁迫，耐寒性，miRNAs，生物信息学

中图分类号：Q943

Bioinformatics analysis of microRNAs and prediction of target genes associated with cold tolerance in sugarcane

Zhu Pengjin, Song Qiqi, Tan Qinliang, Cheng Qin, Li Jiahui, Pang Xinhua, Zhou Quanguang, LÜ Ping, Ou Kewei, Lu Yefei, Nong Zemei, Tang Huanwei, Long Shengfeng

（*Guangxi Subtropical Crops Research Institute*, Nanning 530001, China）

Abstract：To identify the molecular mechanisms of on sugarcane (*Saccharum officinarum*) responding to cold stress, and find the miRNAs and target genes related to cold tolerance，the leaves of different sugarcane genotypes with different cold tolerance treated for 24 h at 4 ℃ were sampled as the materials for high-through transcriptome sequencing with IlluminaHiSeqTM 2000, and 18 sRNA libraries before and after cold stress were constructed. The results were as follows:

收稿日期：2021-01-21

*基金项目：广西自然科学基金项目(2017GXNSFBA198054)；广西创新驱动发展专项(桂科 AA17202042-5)；广西农业科学院基本科研业务专项项目（桂农科 2021YT151）[Supported by Natural Science Foundation of Guangxi(2017GXNSFBA198054)；Guangxi Innovation-driven Development Special Project(Guike AA17202042-5)；Basic Scientific Research Project of Guangxi Academy of Agricultural Sciences（Guinongke 2021YT151）],

作者简介：朱鹏锦，（1983- ），硕士，高级农艺师，主要从事作物生理生态学研究，(E-mail) zhupengjin04@163.com。

*通信作者：龙盛风，助理研究员，主要从事作物栽培育种工作，(E-mail) 15077136500@163.com。

（1）Total 322 known miRNAs of 84 families were discovered, 110 new miRNAs were predicted. 100 differentially expressed miRNAs were screened out from the known miRNAs (61 up-regulated, 39 down-regulated) and 37 differentially expressed miRNAs (15 up-regulated, 22 down-regulated) were screened out from the new miRNAs.（2）1 844 target genes were predicted by using psRNATarget, TargetFinder and Tapirhybrid software. Three main functional categories of these target genes were revealed via the functional analysis of gene ontology, namely molecular function, cellular component and biological process. （3）In order to verify the high-throughput sequencing data, 14 miRNAs and their target genes were selected for qRT-PCR analysis, which showed that most of the expressions of the 14 miRNAs were detected and consistent with the sequencing results. （4）Some miRNA target genes were identified, which involved in plant growth, development, and cold stress responses. This study shows that miRNA directly or indirectly regulates the expression of target genes in cold-tolerant sugarcane, and plays a key role in regulating the important agronomic traits.

Keyword：sugarcane，cold tolerance，miRNAs，bioinformatics

MicroRNAs 是一类 20~24 个碱基的小分子内源性非编码 RNA，具有高度的保守性、时序性和组织特异性(Ambros, 2004)。miRNA 主要在转录后水平上通过介导靶基因 mRNA 的切割或抑制翻译来调节基因的表达，在生物体代谢过程中起到多种调控作用，诸如参与调控植物器官的形态建成(Sunkar, 2004, 2012)、生长发育(Thiebaut, et al., 2012)、激素分泌、信号转导以及对外界环境胁迫(Xiong, 2003)的响应等过程。在拟南芥和水稻响应低温的研究中，发现 miR-167、miR-169、miR-319 和 miR-171 等 miRNA 家族在低温响应具有重要的生物学作用(Sunkar, 2005; Wang et al., 2010)，其中 miR-169 的靶基因为低温诱导的重要基因 CBF (Sunkar et al. , 2007)；还在水稻响应低温胁迫的研究中，证明 miRNA-319 和 miRNA-171 的靶基因属于 MYB 类的转录因子，且两者的表达量互为消长的关系，进而说明 miRNA 在水稻耐低温途径中所起的调控作用(Sunkar et al., 2005; Lü et al., 2010)。因此，

准确高效分离和鉴定 miRNA 及其靶基因并分析它们的功能，更精确地掌握 miRNA 在植物抗逆胁迫过程中的调控机制，是目前植物 miRNA 研究领域的重要内容。

甘蔗是热带、亚热带地区重要的糖料作物，低温是限制其扩大种植区域和实现高产稳产的重要因素之一(吴棉国等, 2010)。出现的偶发性大范围冰冻雨雪或严重的霜冻天气将导致我国甘蔗主产区遭受巨大的经济损失(何燕等, 2009; 匡昭敏等, 2009)；还有广西地理环境特殊，在冬季持续低温以及春季“倒春寒”形成的阴雨霜冻频发以致大面积甘蔗受到冷害，具体表现在甘蔗叶片枯萎、茎杆坏死以致蔗糖含量、甘蔗减产下降(李杨瑞等, 2011)。有研究采集甘蔗主产市县 40 多年的气象数据，结合甘蔗种植面积、甘蔗产量和蔗糖产量等指标进行分析发现低温霜冻灾害是影响甘蔗种植、甘蔗生产和蔗糖产量的主要环境因子(何燕等, 2008; 古丽等, 2011)。因此，了解甘蔗的耐低温调控机制是培育耐寒性强或适合我国热带北缘气候的甘蔗品种的前提。

本研究在观察不同甘蔗品种的田间农艺性状和模拟低温胁迫的生理生化研究基础上，筛选出抗寒能力较强的甘蔗品种作为研究材料，利用高通量测序技术及生物信息学方法，获得与甘蔗响应低温胁迫相关的 miRNA，分析 miRNA 的差异表达情况，明确 miRNAs 与靶基因的作用关系，并对预测所得的靶基因进行基因本体(gene ontology, GO)分析，挖掘低温胁迫应答基因，为选育耐寒性强的优良甘蔗新品种提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

以广西农科院甘蔗研究所选育的‘桂糖 28 号’（GT28）、广西蔗区主栽品种‘新台糖 22 号’（ROC22）和广西亚热带作物研究所新选育的‘桂热 2 号’品种（GR2）为实验材料。

1.2 方法

1.2.1 实验设计与管理

选择无病虫害、蔗茎大小均匀的种茎切成单芽段，先用清水冲洗种茎并用干布擦洗干净，接着用 50%多菌灵可湿性粉剂 1 000 倍液浸 12 h 消毒，再用蒸馏水浸洗种茎 1 min 后，用蒸馏水浸洗拧干的棉布将种茎包好并做好标记，然后用橡皮筋扎好放进温度为 25 ℃的恒温箱催芽。当种茎萌芽并长出幼根时，将其移植到装有营养土的塑料盆并做好标记。每盆 1 段种茎，盆高 17.5 cm，盆宽 16 cm。育苗期间，每株施用完全营养液 2 次，每次 10 mL。当幼苗两叶一心时，选择长势，大小均一的幼苗进行低温处理。低温胁迫处理为 4 ℃，光照强度为 5 000 lx，低温处理 24 h；对照（CK）温度为 28 ℃，光照强度为 5 000 lx。

1.2.2 RNA 提取及 Illumina 测序

采集低温处理和对照样本的叶片，及时用 TRNzol Reagent 试剂盒(天根生化科技有限公司，北京)提取并检测 RNA。将低温胁迫处理组与对照样本组提取获得的高质量 RNA 送往华大基因科技有限公司(深圳)进行文库构建，每个处理 3 个重复。采用 Illumina HiSeq TM 2000

平台对质量合格的 RNA 文库进行测序(Ali et al., 2008; Wang et al., 2009)。通过去接头、去低质量、去污染等过程完成数据处理获得干净序列后，使用 Bowtie2 软件按照 MiRbase > pirnabank > snoRNA(human/plant) > Rfam > other sRNA 的优先级顺序将小 RNA（sRNA）遍历注释获得未注释 RNA 片段。

1.2.3 已知 miRNA 的鉴定及新 miRNA 预测

采用 miRDeep2 软件对所得的未注释 sRNA 序列与参考基因组[割手密(*Saccharum spontaneum*)基因组]进行序列比对分析（Marc, 2008; Maurits et al., 2015)，从而鉴定出已知的甘蔗耐寒相关 miRNAs；将过滤获得的未比对序列比对至参考序列，通过碱基数目延伸、miRNA 结构预测的方法，获得新的 miRNA。

1.2.4 差异表达 miRNA 的鉴定

对耐寒型甘蔗样品的已知 miRNA 的读数进行分析，判断低温胁迫前后不同耐寒型甘蔗样品中 miRNA 的差异表达，以 $|\log2(\text{FoldChange})|\geq1$，$P < 0.05$ 为筛选标准，获得低温胁迫前后差异表达 miRNA。

1.2.5 miRNA 靶基因预测

采用 psRNATarget(Wu, et al. 2012)、TargetFinder(Fahlgren & Carrington 2010)和 Tapirhybrid(Peer, 2010)软件进行差异表达 miRNAs 靶基因预测，并对预测靶基因进 GO 数据库同源性搜索，确定其参与的信号传导及生物代谢途径。

1.2.6 荧光定量 PCR 验证

选取 14 个差异表达 miRNAs 及其靶基因，利用 Premier 5.0 设计其成熟 miRNA 特异正向引物、通用反向引物及 stem loop 引物(表 4)，然后利用 LightCycler® 480 Instrument II 进行 RT-PCR 扩增，设阴性对照(不添加 cDNA 模板)以监控可能的污染。以甘蔗 GAPDH 为内参基因，每个样品均设置 3 次重复，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达。

2 结果与分析

2.1 高通量测序数据分析

选择 3 个耐寒性不同甘蔗品种的幼苗进行低温胁迫，每个品种的对照(CK)和低温处理（T）3 个重复，分别取叶片共 18 个样本进行高通量测序，构建低温胁迫前后 sRNA 文库，然后对原始测序数据进行 3'端去接头、Trim 低质量、片段大小选择等质控处理，获取高质量 Clean Read 序列，结果见表 1。从表 1 可以看出，在 GR2 的 CK 和 T 叶片中分别挖掘出 24 310 558 条、23 925 673 条测序数据，最终处理分别得到 21 343 194 条、21 576 594 条，高质量 Clean Read 序列分别占总序列的 87.83%、90.25%，且所构建的文库与参考基因组进行比对，其 CK 和 T 分别有 86.71%与 84.32%的序列与参考基因组匹配；GT28 的 CK 和 T 叶片中分别挖掘出 23 915 244 条、23 528 103 条测序数据，最终处理分别得到 22 045 186 条、21 481 129 条，高质量 Clean Read 序列分别占总序列的 92.18%与 91.28%，且所构建的文库与参考基因组进行比对，其 CK 和 T 分别有 71.75%与 84.1%的序列与参考基因组匹配；ROCC22 的 CK 和 T 叶片中分别挖掘出 27 069 867 条、23 631 208 条测序数据，最终处理分别得到 21 007 371 条、20 640

357 条，高质量 Clean Read 序列占总序列的 79.5%与 87.35%，且所构建的文库与参考基因组进行比对，其 CK 和 T 分别有 92.62%与 85.67%的序列与参考基因组匹配(表 1)。

表 1 样品测序数据统计

Table 1 Sequencing data statistics of the samples

库 Library	处理 Treatment	样本编号 Sample ID	总序列 Total reads	干净序列 Clean reads	干净序列比 Percentage (%)	匹配基因组 Mapped genome	匹配比例 Percentage（%）
GR2	CK	GR2_1	24 864 865	21 017 789	84.53	17 335 491	82.48
	CK	GR2_2	23 889 311	21 068 679	88.19	17 556 964	83.33
	CK	GR2_3	24 177 497	21 943 114	90.76	20 697 208	94.32
		均值 Mean	24 310 558	21 343 194	87.83	18 529 887	86.71
	T	GR2_1	23 612 049	22 167 436	93.88	17 332 696	78.19
	T	GR2_2	23 331 030	21 905 886	93.89	17 569 575	80.2
	T	GR2_3	23 294 402	21 590 060	92.68	18 360 373	85.04
		均值 Mean	23 925 673	21 576 594	90.25	18 197 456	84.32
GT28	CK	GT28_1	23 077 345	21 109 698	91.47	15 898 066	75.31
	CK	GT28_2	24 699 470	22 556 661	91.32	14 254 489	63.19
	CK	GT28_3	23 968 917	22 469 199	93.74	17 247 280	76.76
		均值 Mean	23 915 244	22045186	92.18	15 799 945	71.75
	T	GT28_1	23 421 689	21 192 257	90.48	16 796 178	79.26
	T	GT28_2	23 271 839	20 918 101	89.89	18 640 603	89.11
	T	GT28_3	23 890 781	22 333 031	93.48	18 743 809	83.93
		均值 Mean	23 528 103	21 481 129	91.28	18 060 196	84.1

库 Library	处理 Treatment	样本编号 Sample ID	总序列 Total reads	干净序列 Clean reads	干净序列比 Percentage (%)	匹配基因组 Mapped genome	匹配比例 Percentage （%）
ROC22	CK	ROC22_1	23475518	20335619	86.62	17536453	86.24
	CK	ROC22_2	32786885	20072677	61.22	19292598	96.11
	CK	ROC22_3	24947198	22613819	90.65	21598010	95.51
		均值 Mean	27069867	21007371	79.5	19475687	92.62
	T	ROC22_1	24211511	21189727	87.52	18402946	86.85
	T	ROC22_2	23491833	20043323	85.32	17201360	85.82
	T	ROC22_3	23190281	20688022	89.21	17448123	84.34
		均值 Mean	23631208	20640357	87.35	17684143	85.67

sRNA 长度与不同功能有关，其中 21~22 nt 的主要与 mRNA 切割和转录后基因沉默相关，24 nt 的主要与 RNA 导向的 DNA 甲基化和转录基因沉默相关。我们对 Total clean reads 进行统计，发现 sRNA 主要集中在 21 ~24 nt 之间，但不同抗寒能力的材料之间有一定差异，且不同长度的测序频率不同(图 1)。

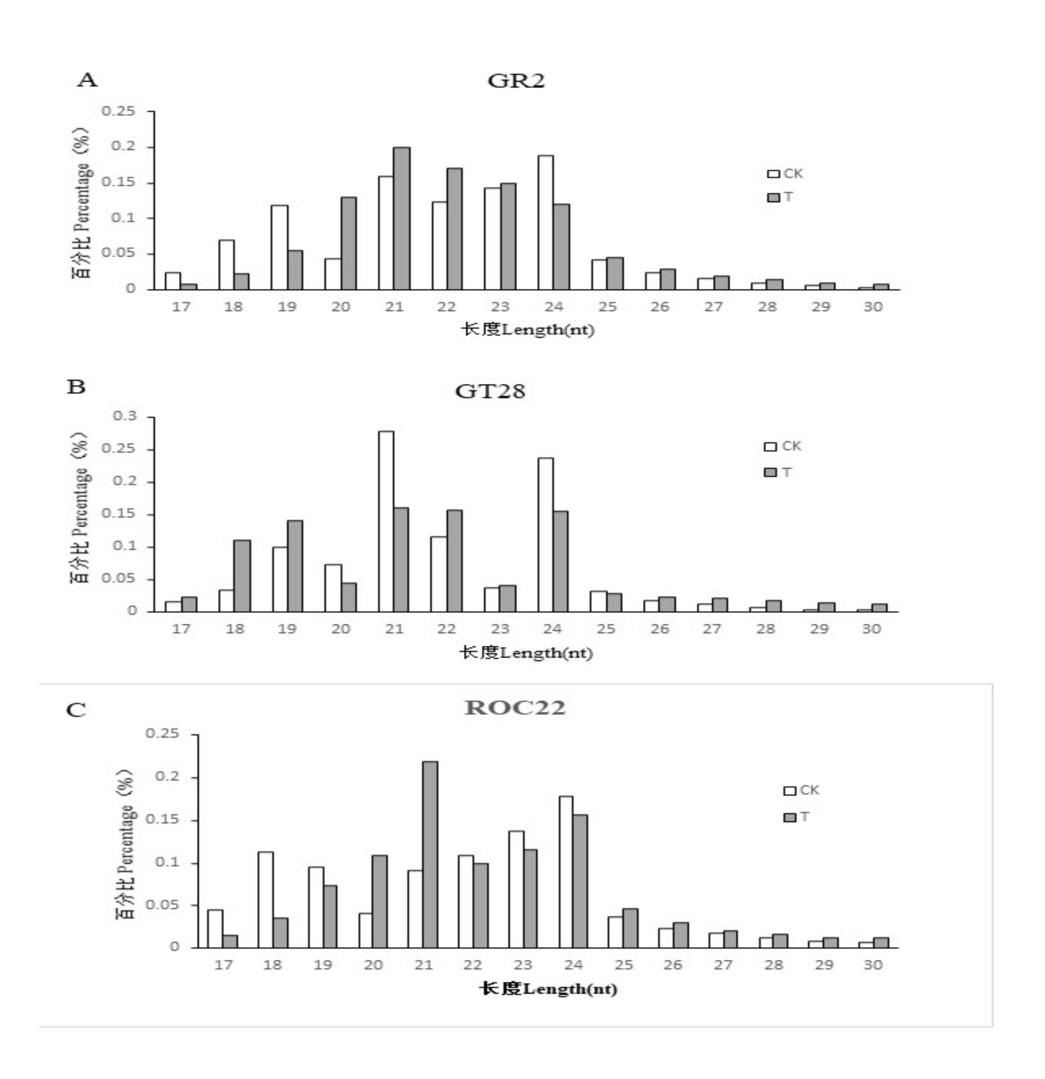
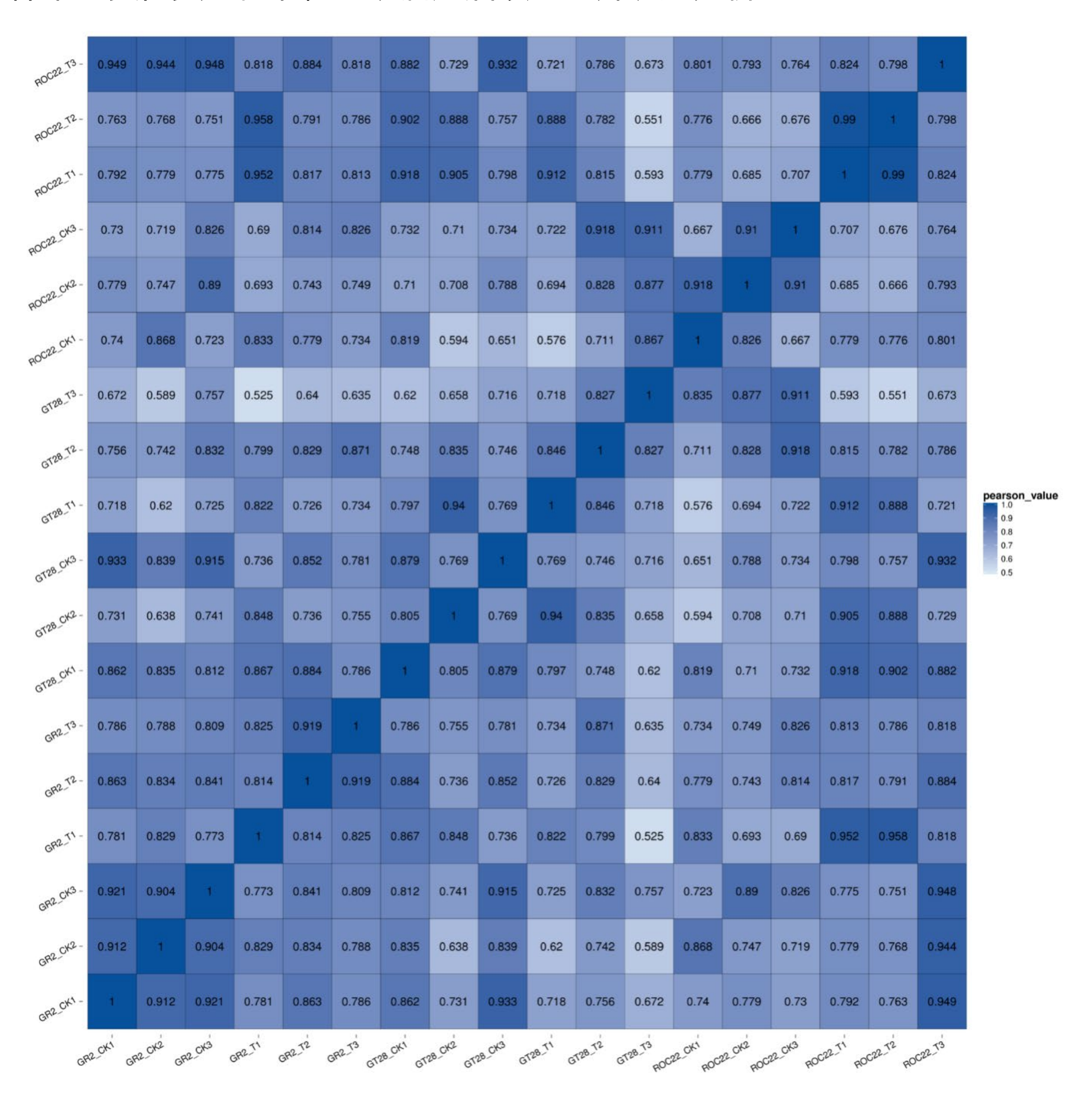


图 1 长度分布图

Fig. 1 sRNA length distribution

进一步对每个重复样品之间，根据基因表达量进行 Pearson 相关系数计算，并将这些系数以热图的形式反映出来（图 2)。从 Pearson

相关系数可以看出，同一品种相同处理的重复样品间相关性较高（0.667~0.990），表明所有样品的表达量基本保持一致，说明其符合样本重复性实验标准，可以满足后续的差异表达分析。



X、Y 轴均代表每个样品。颜色代表相关性系数，颜色越蓝代表相关性越高，颜色越浅代表相关性越低。

X and Y axis represent each sample. The color represents the correlation coefficient. The bluer the color, the higher the correlation； and the lighter the color, the lower the correlation.

图 2 样品间相关性分析热图

Fig. 2 Correlation heatmap of the different samples

2.2 已知 miRNA 分析及新 miRNA 预测

利用 AASRA 软件将核苷酸序列比对到参考基因组及 miRBase 数据库中，鉴定得到分属于 84 个已知 miRNA 家族的 322 个 miRNA，其中对照组中的 297 个 miRNA 分属于 69 个家族，低温处理组中的 305 个 miRNA 分属于 74 个家族，在这些家族中，拥有最多家族成员数量的为 miR169(32 个)，其次分别为 miR166、miR171、miR167、miR156、miR396 (图 3)。

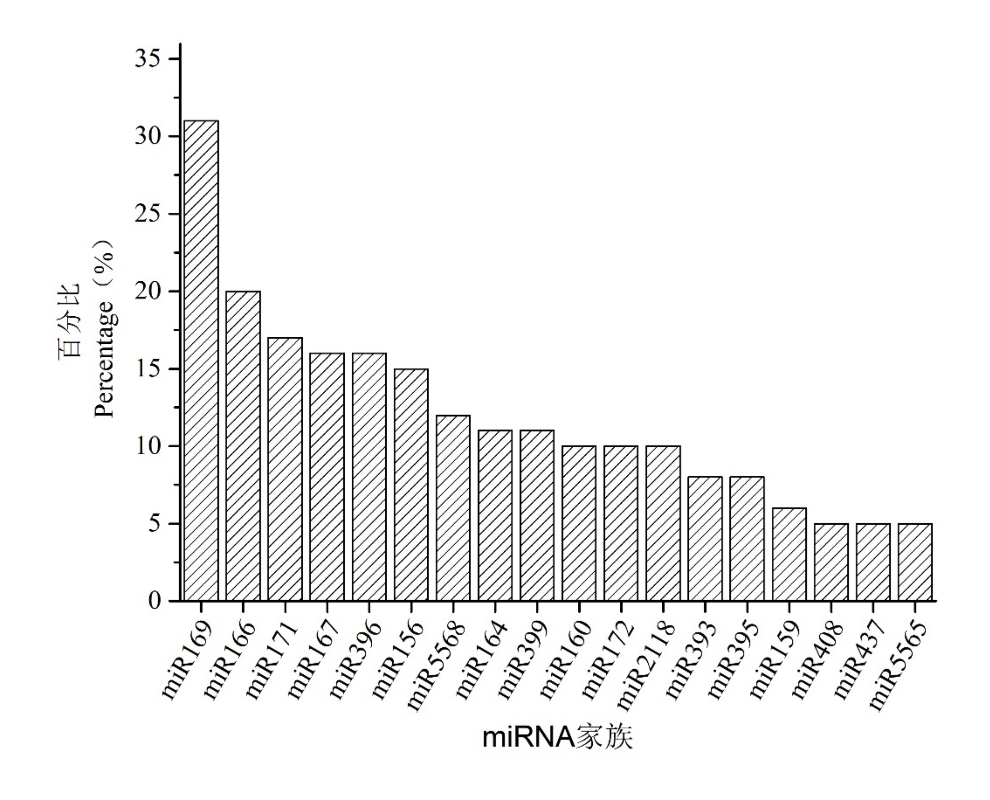


图 3 miRNA 家族数量分布前 18 位

Fig. 3 The top 18 miRNA family members

根据成熟植物 miRNA 序列的高度保守型及 miRNA 前体拥有标志性发夹结构的特性，利用同源搜寻比对的方法在割手密 miRBase

数据库中进行搜索，对具有同源性的 miRNA 序列进行提取，选取其中表达量最高的作为甘蔗响应低温的保守 miRNA 的候选者，最终得到甘蔗响应低温的新 miRNA 110 个。

2.3 差异表达 miRNA 分析

通过比较对照组与处理组 miRNA 的表达量变化情况，可以判断低温胁迫下抗寒能力不同的甘蔗品种 miRNA 的差异表达情况。在差异表达 miRNA 检测过程中，以|log2(FC)|≥2，*P*<0.05 作为筛选标准，低温胁迫时差异表达 miRNA 如表 2 所示，包括 100 个已知 miRNAs (61 个上调，39 个下调)，37 个新 miRNAs (15 个上调，22 个下调)。呈下调趋势的 miRNA 家族包括 miR8175、miR5564、miR444、miR166 在内的 21 个家族，呈上调趋势的 miRNA 家族包括 miR156、miR169、miR172、miR393、miR397、miR408 等 10 个家族。这些具有差异性表达的 miRNA 在甘蔗响应低温胁迫情况下可能发挥特定的功能。

表 2 甘蔗响应低温差异表达 miRNA

Tab. 2 Differential expression of miRNAs of sugarcane in response to low temperature

序号 No.	家族 Family	miRNA 编号 miRNA ID	对照表达量 Expression (CK)	处理表达量 Expression (T)	log2FC	*P* 值 Pvalue	趋势 Up/Down
1	miR156	miR156	28.734	948.957	5.045	0.000 35	Up
		miR156c-3p_2	12.607	112.513	3.158	0.000 15	Up
		miR156e-3p	122.352	13.266	-3.205	0.000 11	Down
		miR156f-5p	31.991	201.084	2.652	0.001 10	Up
		miR156k-3p	126.664	51.112	-1.309	0.021 58	Down
2	miR159	miR159a_1	136 9.123	620.576	-1.142	0.021 27	Down
		miR159a_4	78.216	15.693	-2.317	0.000 02	Down
		miR159a-5p_4	241.182	820 8.194	5.089	0.000 00	Up
3	miR160	miR160	332.983	436 13.722	7.033	0.000 00	Up
		miR160a-3p_3	68.014	366.331	2.429	0.006 62	Up
		miR160a-3p_4	32.520	421.932	3.698	0.000 00	Up
		miR160e-3p	206.117	693.955	1.751	0.010 93	Up

序号 No.	家族 Family	miRNA 编号 miRNA ID	对照表达量 Expression (CK)	处理表达量 Expression (T)	log2FC	*P* 值 Pvalue	趋势 Up/Down
		miR160f-5p	138 0.969	441.538	-1.645	0.006 59	Down
		miR160g_1	185.534	24.856	-2.900	0.000 04	Down
4	miR162	miR162-5p	231.769	225 8.160	3.284	0.000 46	Up
		miR162a-3p	739.997	28.331	-4.707	0.001 77	Down
5	miR164	miR164b-3p_2	5.405	51.477	3.252	0.000 21	Up
		miR164c-3p_2	4.473	186.499	5.382	0.000 00	Up
		miR164f-3p	0.604	12.768	4.403	0.00864	Up
6	miR166	miR166a	365.383	109.611	-1.737	0.000 00	Down
		miR166a-5p_1	35.859	164.403	2.197	0.021 08	Up
		miR166d-5p_2	661.392	566 8.546	3.099	0.000 13	Up
		miR166h-3p_1	601 9.722	269 4.272	-1.160	0.010 14	Down
		miR166k-3p	102 1.709	469.918	-1.121	0.004 79	Down
		miR166m_1	596.293	124.197	-2.263	0.000 02	Down
		miR166m_2	204.395	7.433	-4.781	0.000 46	Down
7	miR167	miR167a-5p	654.093	176.527	-1.890	0.000 20	Down
		miR167d	540 2.076	579 07.162	3.422	0.000 14	Up
		miR167d_1	790.952	21.143	-5.207	0.000 00	Down
		miR167d-3p_5	4.235	37.787	3.157	0.003 92	Up
		miR167g-3p	4.047	21.062	2.380	0.003 16	Up
8	miR168	miR168a-3p_2	749 8.058	362 33.268	2.273	0.000 03	Up
9	miR169	miR169a-3p_3	1.682	36.573	4.443	0.000 74	Up
		miR169c-3p_1	10.808	65.672	2.603	0.000 17	Up
		miR169c-3p_5	25.511	579.499	4.506	0.000 00	Up
		miR169d-3p_3	357.242	461 8.614	3.692	0.000 28	Up
		miR169d-5p_1	65.463	107 9.187	4.043	0.001 27	Up
		miR169e_2	20.181	2.225	-3.181	0.003 14	Down
		miR169e_3	3.082	26.689	3.114	0.004 26	Up
		miR169e-3p_1	58.233	241.058	2.049	0.010 57	Up
		miR169h_2	7.341	93.031	3.664	0.006 36	Up
		miR169k-5p	161.245	727.733	2.174	0.001 56	Up
		miR169m	3.793	76.157	4.328	0.000 14	Up
		miR169m-5p	1.199	18.117	3.917	0.002 27	Up
		miR169r-3p	3.887	78.355	4.333	0.000 04	Up
		miR169r-5p	2.751	68.185	4.631	0.000 00	Up
10	miR171	miR171a_3	65.519	23.729	-1.465	0.017 88	Down
		miR171a-3p	15.331	4.377	-1.808	0.020 04	Down
		miR171b-3p_3	137.790	170 3.706	3.628	0.003 49	Up
		miR171e-5p_1	9.596	43.006	2.164	0.006 55	Up
		miR171f	8.261	0.281	-4.879	0.001 25	Down
		miR171i_1	222 8.766	818.757	-1.445	0.000 02	Down

序号 No.	家族 Family	miRNA 编号 miRNA ID	对照表达量 Expression (CK)	处理表达量 Expression (T)	log2FC	*P* 值 Pvalue	趋势 Up/Down
11	miR172	miR172a_2	12. 532	1. 849	-2. 761	0. 010 41	Down
		miR172b-5p_3	346. 643	276 3. 508	2. 995	0. 001 70	Up
		miR172d-5p_4	105. 771	523. 500	2. 307	0. 013 72	Up
12	miR2118	miR2118a_2	26. 740	4. 574	-2. 548	0. 001 31	Down
		miR2118b	533 9. 363	209 7. 461	-1. 348	0. 014 70	Down
		miR2118d	96. 120	402. 856	2. 067	0. 000 81	Up
		miR2118f_1	90. 692	521. 181	2. 523	0. 006 67	Up
		miR2118g	66. 283	5. 469	-3. 599	0. 000 01	Down
		miR2118p	498. 943	1827. 679	1. 873	0. 012 49	Up
13	miR390	miR390-3p_2	2. 069	15. 562	2. 911	0. 004 43	Up
14	miR393	miR393-3p_1	53. 725	698. 525	3. 701	0. 000 01	Up
		miR393a_3	107. 640	542. 872	2. 334	0. 000 34	Up
15	miR395	miR395h-5p	2. 586	30. 738	3. 571	0. 008 14	Up
16	miR396	miR396a-3p_4	1. 601	25. 432	3. 989	0. 003 31	Up
		miR396a-5p	180. 860	17. 171	-3. 397	0. 000 51	Down
		miR396b	13. 610	271. 022	4. 316	0. 000 00	Up
		miR396b-3p_1	6. 136	73. 003	3. 573	0. 000 46	Up
		miR396b-3p_3	35. 226	177. 642	2. 334	0. 000 78	Up
		miR396b-5p	183. 564	51. 783	-1. 826	0. 000 80	Down
		miR396e-3p_1	182. 946	44. 050	-2. 054	0. 010 03	Down
		miR396g	138. 206	55. 367	-1. 320	0. 010 45	Down
		miR396h	7. 617	1. 352	-2. 495	0. 012 08	Down
17	miR397	miR397-3p_3	215. 647	263 7. 398	3. 612	0. 001 77	Up
		miR397a_3	27. 767	336. 211	3. 598	0. 001 87	Up
18	miR398	miR398a-3p_2	11. 259	119. 098	3. 403	0. 005 51	Up
		miR398b	20. 516	160 8. 552	6. 293	0. 000 03	Up
19	miR399	miR399_1	16. 048	1. 571	-3. 353	0. 003 10	Down
		miR399b-5p_1	14. 959	76. 405	2. 353	0. 010 00	Up
		miR399e-5p	79. 589	295. 499	1. 893	0. 002 30	Up
		miR399k_1	35. 366	154. 991	2. 132	0. 000 73	Up
20	miR408	miR408-3p_1	951. 933	111 95. 030	3. 556	0. 020 29	Up
		miR408-5p_9	6. 759	599. 555	6. 471	0. 000 00	Up
		miR408b_1	16. 628	467. 667	4. 814	0. 000 39	Up
		miR408d	116. 205	230 6. 584	4. 311	0. 000 71	Up
21	miR444	miR444b. 2	946 6. 966	226 9. 188	-2. 061	0. 001 85	Down
22	miR4995	miR4995	297. 645	71. 203	-2. 064	0. 018 57	Down
23	miR5139	miR5139	43. 723	7. 385	-2. 566	0. 010 29	Down
24	miR529	miR529-3p	42. 770	5. 191	-3. 042	0. 000 55	Down
25	miR530	miR530a_2	24. 562	4. 006	-2. 616	0. 017 36	Down
26	miR5505	miR5505	13. 384	0. 482	-4. 795	0. 000 04	Down
27	miR5523	miR5523	9. 527	0. 604	-3. 979	0. 002 70	Down
28	miR5564	miR5564c-5p	205 7. 141	274. 385	-2. 906	0. 000 00	Down
29	miR5568	miR5568c-3p	2. 390	23. 041	3. 269	0. 003 51	Up
30	miR6218	miR6218-5p	4. 570	20. 811	2. 187	0. 008 34	Up
31	miR6221	miR6221-5p	50. 052	12. 539	-1. 997	0. 009 55	Down
32	miR6223	miR6223-5p	14. 898	249. 912	4. 068	0. 000 00	Up
33	miR6224	miR6234a-3p	0. 548	7. 645	3. 801	0. 004 88	Up
34	miR8175	miR8175	707. 142	270. 620	-1. 386	0. 007 87	Down

序号 No.	家族 Family	miRNA 编号 miRNA ID	对照表达量 Expression (CK)	处理表达量 Expression (T)	log2FC	*P* 值 Pvalue	趋势 Up/Down
35	n_mir104	novel_mir104	616 0.659	415.650	-3.890	0.000 05	Down
36	n_mir106	novel_mir106	47.411	1153.668	4.605	0.000 02	Up
37	n_mir107	novel_mir107	9.744	171.505	4.138	0.000 24	Up
38	n_mir108	novel_mir108	891.184	72.596	-3.618	0.000 09	Down
39	n_mir109	novel_mir109	16.716	194.103	3.538	0.001 33	Up
40	n_mir11	novel_mir11	660.280	325 8.241	2.303	0.003 16	Up
41	n_mir110	novel_mir110	27.128	0.344	-6.302	0.000 01	Down
42	n_mir15	novel_mir15	17.837	0.338	-5.724	0.000 08	Down
43	n_mir17	novel_mir17	11.582	0.296	-5.288	0.000 33	Down
44	n_mir20	novel_mir20	0.748	142.501	7.573	0.000 00	Up
45	n_mir23	novel_mir23	23.022	0.352	-6.032	0.000 02	Down
46	n_mir24	novel_mir24	248.551	74.516	-1.738	0.012 12	Down
47	n_mir25	novel_mir25	241.891	788.583	1.705	0.003 72	Up
48	n_mir26	novel_mir26	148.771	43.014	-1.790	0.001 28	Down
49	n_mir27	novel_mir27	11.000	0.643	-4.096	0.008 96	Down
50	n_mir29	novel_mir29	204 4.588	335.897	-2.606	0.000 34	Down
51	n_mir3	novel_mir3	12.479	0.790	-3.982	0.001 83	Down
52	n_mir34	novel_mir34	0.545	20.981	5.267	0.000 89	Up
53	n_mir36	novel_mir36	37.565	0.505	-6.218	0.000 01	Down
54	n_mir37	novel_mir37	20.896	662.275	4.986	0.00000	Up
55	n_mir42	novel_mir42	102 2.840	358.059	-1.514	0.005 06	Down
56	n_mir47	novel_mir47	13.512	0.680	-4.313	0.013 92	Down
57	n_mir51	novel_mir51	0.535	121.564	7.828	0.000 00	Up
58	n_mir53	novel_mir53	577.260	169.427	-1.769	0.009 58	Down
59	n_mir58	novel_mir58	68.047	926.881	3.768	0.006 66	Up
60	n_mir61	novel_mir61	191 2.408	432.242	-2.145	0.000 00	Down
61	n_mir62	novel_mir62	180.637	63.979	-1.497	0.020 85	Down
62	n_mir64	novel_mir64	7.505	0.474	-3.984	0.024 09	Down
63	n_mir65	novel_mir65	0.618	37.647	5.929	0.000 00	Up
64	n_mir72	novel_mir72	0.828	260.425	8.296	0.000 00	Up
65	n_mir75	novel_mir75	186.658	37.721	-2.307	0.001 83	Down
66	n_mir82	novel_mir82	190.143	854.423	2.168	0.011 08	Up
67	n_mir84	novel_mir84	12.396	0.662	-4.227	0.006 72	Down
68	n_mir86	novel_mir86	0.439	11.476	4.709	0.003 54	Up
69	n_mir89	novel_mir89	5.958	0.419	-3.828	0.021 37	Down
70	n_mir95	novel_mir95	294.205	33.471	-3.136	0.008 67	Down
71	n_mir96	novel_mir96	0.862	51.926	5.912	0.000 16	Up

2.4 miRNA 作用靶基因预测与分析

根据筛选差异表达的 miRNA 与对应物种的基因序列信息，使用

psRobot、TargetFinder 和 Tapurhybrid 软件进行靶基因预测，结果见图 4。3 种预测方法共预测了 1 844 个相同的潜在靶基因，其中 1 696 个属于已知 miRNA 靶基因，148 个属于新 miRNA 靶基因。为进一步分析预测所得靶基因的潜在生物学功能，对预测所得的靶基因进行 GO 分析，共鉴定出甘蔗响应低温胁迫 miRNA 靶基因在生物过程（Biological process）有 13 个功能亚类，在细胞组分（Cellular component）有 11 个功能亚类，在分子功能（Molecular function）有 7 个功能亚类(图 4)。在生物过程类别中，预测靶基因的主要生物学功能富集于细胞过程和代谢过程；在细胞组分类别中，预测靶基因生物学功能主要富集于细胞、细胞器和生物膜；在分子功能类别中，预测靶基因生物学功能主要富集于结合和催化活性及转运活性。绝大多数的靶基因功能均与这些结合功能及其他相近的结合功能相关。大多数 miRNA 通过直接或者间接介导靶基因的表达调控相关代谢途径响应低温胁迫，这些 miRNA 所调控的靶基因对甘蔗的耐寒性起着关键的调控作用（表 3）。

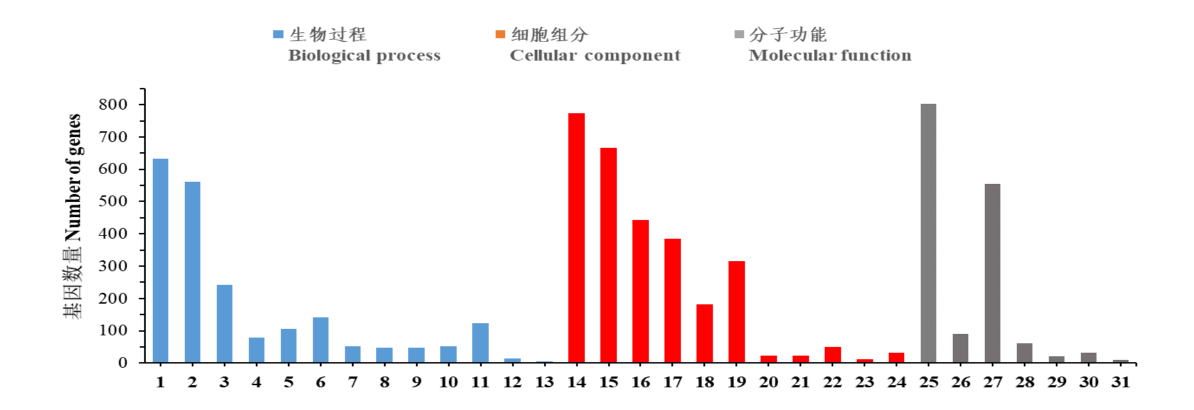


图 4 差异表达 miRNAs 靶基因的 GO 功能分析

Fig. 4 GO analysis of target genes for differentially expressed miRNAs

1. 细胞过程; 2. 代谢过程;3.生物调节; 4. 发育过程; 5. 定位; 6. 响应刺激; 7. 多细胞有机体过程; 8. 繁殖; 9. 繁殖过程; 10. 信号传导; 11. 细胞成分组织或生物发生; 12.多有机体过程; 13. 生长; 14. 细胞 Cell; 15. 细胞器; 16. 细胞膜；17. 细胞膜部分; 18. 蛋白复合体; 19. 细胞器部分; 20. 细胞连接; 21. 共质体; 22. 膜包管腔; 23. 超分子复合体; 24. 胞外区; 25. 结合; 26. 转录因子活性; 27. 催化活性; 28. 转运活性; 29. 结构分子活性; 30. 分子功能因子; 31. 抗氧化活性.

1. Cellular process；2. Metabolic process；3. Biological regulation；4. Developmental process；5. Localization；6. Response to stimulus; 7. Multicellular organismal process; 8. Reproduction; 9. Reproductive process; 10. Signaling; 11. Cellular component organization or biogenesis; 12. Multi-organism process; 13. Growth; 14. Cell; 15. Organelle; 16. Membrane; 17. Membrane part; 18. Protein-containing complex; 19. Organelle part; 20. Cell junction; 21. Symplast; 22. Membrane-enclosed lumen; 23. Supramolecular complex; 24. Extracellular region; 25. Binding; 26. Transcription regulator activity; 27. Catalytic activity; 28. Transporter activity; 29. Structural molecule activity; 30. Molecular function regulator; 31. Antioxidant activity.

表 3 部分甘蔗响应低温 miRNAs 及其靶基因

Tab. 3 Some potential target genes for miRNAs in sugarcane responding to low temperature

miRNA 编号 miRNA ID	表达趋势 Expression	靶基因编号 Targets ID	期望值 Expectation	功能描述 Functional description
miR156	下调 Down	Sspon.03G0000360-3C	3	鳞状类启动子结合蛋白 13 Squamosa promoter-binding-like protein 13
miR160g_1	下调 Down	Sspon.01G0019580-1A	2	生长素响应因子 22 Auxin response factor 22
		Sspon.04G0008020-4D	3	生长素响应因子 8 Auxin response factor 8
miR167d	上调 Up	Sspon.01G0032360-1A	3	前番茄红素异构酶 1，叶绿体 Prolycopene isomerase 1, chloroplastic
		Sspon.01G0032360-2D	3	类胡萝卜素异构酶 1 同型 X1 Carotenoid isomerase 1 isoform X1
miR169a-3p_3	上调 Up	Sspon.01G0004210-1A	2.5	转录因子 Y 亚基 A-7 异构体 X1 Nuclear transcription factor Y subunit A-7 isoform X1
		Sspon.01G0040290-2D	2.5	转录因子 Y 亚基 A-4 Nuclear transcription factor Y subunit A-4
		Sspon.02G0034130-2C	2.5	转录因子 Y 亚基 A-3 Nuclear transcription factor Y subunit A-3
miR171b-3p_3	上调 Up	Sspon.01G0000260-3P	3	稻草人相似蛋白 6 Scarecrow-like protein 6
		Sspon.04G0006810-1A	3	稻草人相似蛋白 27 Scarecrow-like protein 27
miR172d-5p_4	上调	Sspon.02G0011120-1A	3.5	转录因子 bHLH49

miRNA 编号 miRNA ID	表达趋势 Expression	靶基因编号 Targets ID	期望值 Expectation	功能描述 Functional description
	Up			Transcription factor bHLH49-like
		Sspon.03G0021730-1A	3.5	mRNA 前体加工蛋白 40A Pre-mRNA-processing protein 40A
		Sspon.04G0008430-4D	3.5	微管相关/结合蛋白 microtubule-associated protein futsch
		Sspon.07G0023470-1B	3	DUF1682 家族蛋白 DUF1682 family protein
miR2118d	上调 Up	Sspon.01G0014780-1A	3	酪蛋白激酶 II 亚基 β-4 Putative casein kinase II subunit beta-4
miR393-3p_1	上调 Up	Sspon.05G0020400-1P	3	α -L-阿拉伯糖苷酶 1 Alpha-L-arabinofuranosidase 1
miR396b	上调 Up	Sspon.04G0022140-2C	3	光合系统 II 放氧增强蛋白 2 Photosystem II oxygen-evolving enhancer protein 2
miR397a_3	上调 Up	Sspon.01G0027900-2C	3	衰老特定的半胱氨酸蛋白酶 SAG39 Senescence-specific cysteine protease SAG39
		Sspon.04G0017800-3D	3	浓缩素-2 复合物亚基 D3 Condensin-2 complex subunit D3
miR398b	上调 Up	Sspon.03G0028270-2P	3	硒结合蛋白 1 Selenium-binding protein 1
miR399k_1	上调 Up	Sspon.07G0021800-1B	3.5	泛素结合酶 E2 23 Probable ubiquitin-conjugating enzyme E2 23
miR408d	上调 Up	Sspon.01G0047030-3D	3.5	类质体蓝素前体 Chemocyanin precursor
		Sspon.07G0017290-2B	3	小亚基核糖体 S23 Small subunit ribosomal protein S23

miRNA 编号 miRNA ID	表达趋势 Expression	靶基因编号 Targets ID	期望值 Expectation	功能描述 Functional description
miR5140	下调 Down	Sspon.03G0002860-2B	3.5	核糖核酸酶 II，叶绿体/线粒体异构体 X1 Ribonuclease II, chloroplastic/mitochondrial isoform X1
		Sspon.07G0015510-1A	3	转位子 Transposon protein, putative, unclassified
miR530a_2	下调 Down	Sspon.02G0012470-1A	3.5	凋亡前期丝氨酸蛋白酶 NMA111 Pro-apoptotic serine protease NMA111
		Sspon.05G0000530-2D	3.5	含酰基辅酶 A 结合域的蛋白质 1 Acyl-CoA-binding domain-containing protein 1
miR5523	下调 Down	Sspon.02G0001670-3D	3.5	泛素羧基端水解酶 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
miR5564c-5p	下调 Down	Sspon.06G0002720-3D	3	3'-5'-核糖核酸外切酶家组蛋白 3'-5'-exoribonuclease family protein
miR5568c-3p	上调 Up	Sspon.01G0013100-1A	3	海藻糖酶异构体 X1 Probable trehalase isoform X1
		Sspon.01G0014700-3C	3	丙二酰辅酶 A 酰基载体蛋白转酰酶 Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase
		Sspon.01G0033120-1A	2.5	5-羟脯氨酸酶 5-oxoprolinase
		Sspon.01G0033150-1P	3.5	内质网相关的降解蛋白 Derlin-2.2
		Sspon.03G0010210-1P	3	线粒体苹果酸脱氢酶 2 Malate dehydrogenase 2 mitochondrial
		Sspon.04G0006870-1A	3.5	海藻糖磷酸酶 1

miRNA 编号 miRNA ID	表达趋势 Expression	靶基因编号 Targets ID	期望值 Expectation	功能描述 Functional description
miR6218-5p	上调 Up	Sspon.01G0003280-1A	3.5	Probable trehalose-phosphate phosphatase 1 ABC 转运蛋白 G 家族成员 22 同型 X2 ABC transporter G family member 22 isoform X2
		Sspon.02G0047980-1C	3.5	60S 核糖体蛋白 L36a 60S ribosomal protein L36a, partial
miR6234a-3p	上调 Up	Sspon.07G0037700-1D	3	过氧化物酶体生成蛋白-14 Peroxin-14
novel_mir23	下调 Down	Sspon.01G0023790-2P	3.5	生长素响应蛋白 Auxin-responsive protein IAA30
		Sspon.01G0039360-1P	3.5	DNA 解旋酶 INO80 DNA helicase INO80
		Sspon.02G0004350-3D	3.5	液泡膜蛋白 KMS1 Vacuole membrane protein KMS1
		Sspon.02G0014140-3D	2	E3 泛素蛋白连接酶 AIP2 E3 ubiquitin-protein ligase AIP2
		Sspon.02G0014480-3C	2	胚乳碱性亮氨酸拉链转录激活因子 5 Opaque endosperm 5
novel_mir36	下调 Down	Sspon.04G0017230-1A	2.5	鳞状类启动子结合蛋白 4Squamosa promoter-binding-like protein 4
		Sspon.07G0022740-1B	3.5	50S 核糖体蛋白 L33 50S ribosomal protein L33
novel_mir90	下调 Down	Sspon.08G0003790-2B	2.5	水解 O- 和 S-糖基复合物 Hydrolyse O- and S-glycosyl compounds

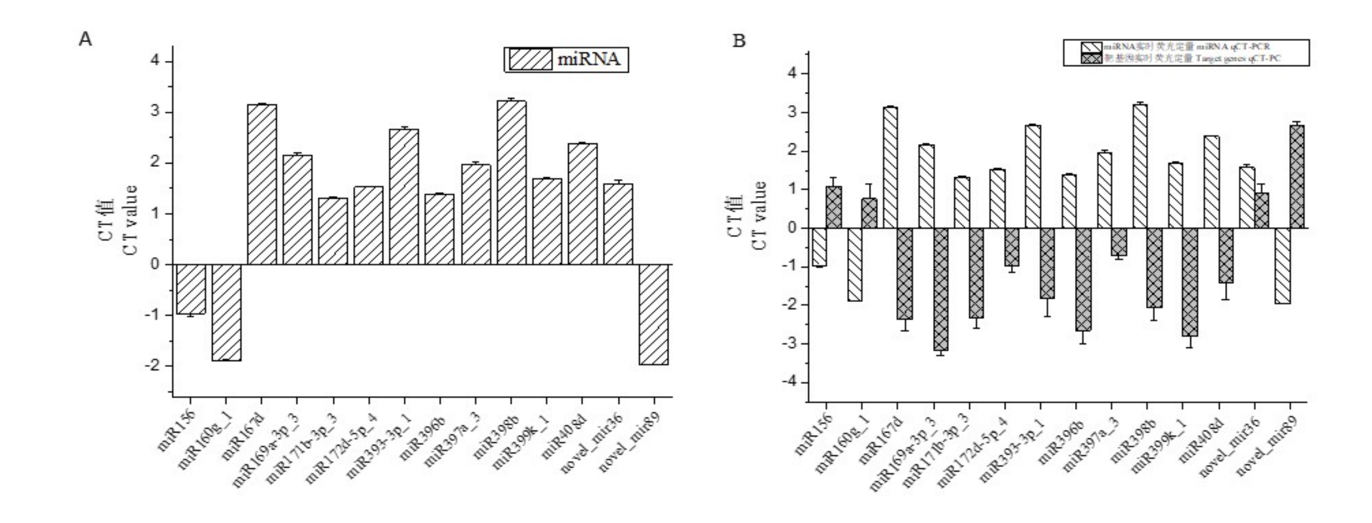
2.6 qRT-PCR 验证

利用 qRT-PCR 技术对测序所得到的 miRNA 及靶基因的差异丰度进行验证，而 miRNA 及其靶基因的引物序列如表 4 所示。在对照组与低温处理中共筛选出 14 个差异表达的 miRNA 及其靶基因对其进行 RT-PCR 验证，包括 miR156、miR160g_1、miR167d、miR169 a-3p_3、miR171b-3p_3、miR172d-5p_4、miR393-3p_1、miR396b、 miR397a_3、miR398b、miR399k_1、miR408d、novel_mir36、novel_mir89(图 5)。根据表 4 和图 5 的结果，除 novel-miR36 外，选择的其余 13 个 miRNA 在 qRT-PCR 实验中的表达模式与高通量测序检测到的表达模式一致(图 5：A)，这表明大部分高通量测序的结果均能被荧光定量 PCR 技术所验证，此次研究数据为真实可信的。所筛选的 14 个 miRNA 中，除 novel-miR36 以外，其余 13 个 miRNA 均与其靶基因呈负调控关系(图 5：B)，证明 miRNA 通常以负调控或沉默靶基因的方式来调控植物的生长、发育及对环境的应激反应。

表 4 miRNAs 和靶基因 qRT-PCR 引物设计

Tab. 4 The primer of miRNAs and target's gene for qRT-PCR

miRNA 编号 miRNA ID	引物 Primer	靶基因编号 Target genes ID	引物 primer	
			正向引物(5′－3′) Forward primer (5′－3′)	反向引物(5′－3′) Reverse primer (5′－3′)
miR156	CGCTGACAGAAGAGAGTGAGCAC	Sspon.03G0000360-3C	GGCACAACTGAGAGCACACCTT	ACTACATTGGATGGCAGCACCT
miR160g_1	TATATGCCTGGCTCCTTGTATGCCA	Sspon.01G0019580-1A	GGAGCACCTTCGTCAACCACAA	ATGCACTCCATGCCACCACAG
miR167d	TGAAGCTGCCAGCATGATCTGG	Sspon.01G0032360-2D	CCAGGATGCTTGCTTGAGTACC	TGACACCAACTGCTCGACCATT
miR169a-3p_3	CCATAGCCAAGGATGACTTGCCG	Sspon.01G0004210-1A	ACGAGCGAAGCAAAGCAAGGT	AGAGCAAGTCAGCGAGGAAGGA
miR171b-3p_3	CTTGAGCCGTGCCAATATCACG	Sspon.01G0000260-3P	TGGATCATTGGCGGCGAGGA	CAGGAAGTTGGGCGTGTGGA
miR172d-5p_4	GCGCAGCACCATCAAGATTCAC	Sspon.02G0011120-1A	GATGGTGCTGGTGTCGTTCTGA	CCTCCTCTACCTTCGGCTTCAC
miR393-3p_1	CCGCAGTGCAATCCCTTTGGAATT	Sspon.05G0020400-1P	GCTTCGCCTCCTGCTTCTTCT	TCCACCATCCGATACCTCCTCT
miR396b	CGCGTTCCACAGCTTTCTTGAACT	Sspon.04G0022140-2C	AGGGTTACACGATTCCGCTTGA	CGCCTTCTGCTCTGCCACAT
miR397a_3	CGTCATTGAGTGCAGCGTTGATG	Sspon.04G0017800-3D	CCGCCAATAAGGTCGTCGTCAC	GGTACGCCTTGTGCAGCTTCTC
miR398b	TATATAGGGGCGGACTGGGAACAC	Sspon.03G0028270-2P	CGCCGCTTCCTGATCTTACCTT	CGACATACACACGACCTGACCT
miR399k_1	TGCCAAAGGAAATTTGCCCCG	Sspon.07G0021800-1B	TGGAGGAATTGGAGCCGTTGGA	AGAGCCGAGCACCGAAGAAGAG
miR408d	TGCACTGCCTCTTCCCTGG	Sspon.07G0017290-2B	GATGCCGTTAGGGTCAGGACAA	AGCACAGCGGTTCCAACACAA
novel_mir36	GCGATTGACAGAAGAGAGTGAGCAC	Sspon.08G0015870-2B	TCGCTTGGATCGTTGAGAATTG	ACATAGGCTGCTGCTAGTACC
novel_mir89	TCGACTCCCACTGTGGTCG	Sspon.08G0003790-2B	TCGGCGTCCCTGGTGTTCAA	CAGAGCGTGAAGGTGTCGTTCC



A. miRNA qRT-PCR 检验; B. 靶基因 qRT-PCR 检验。
A. The results of miRNA qRT-PCR; B. The results of target genes.

图 5 miRNA 及其靶基因 qRT-PCR 分析

Fig. 5 qRT-PCR analysis of miRNA and target genes

3 讨论与结论

miRNA 是在植物中广泛分布的一类非编码小 RNA 分子，在植物生长、发育和对环境应激反应中发挥着关键的调控作用(刘运华等, 2007; 郭韬等, 2011)。甘蔗热带种原产热带地区，喜温，现代甘蔗栽培品种以热带种的种质为主体。作为广西传统的主导产业，而低温不仅是限制其扩大种植区域和实现高产稳产的重要因素之一，还影响蔗农收益和糖业稳定发展(苏永秀等, 2006)。为了解甘蔗响应低温的内在分子机制，挖掘其与耐寒相关的 miRNAs 及相关靶基因，本研究对不同基因型甘蔗进行低温胁迫处理，通过高通量测序技术及生物信息学方法，系统分析不同抗寒能力的甘蔗对低温胁迫的响。

通过高通量测序技术及生物信息学分析，我们发现 sRNA 主要集

中在 21~24 nt 之间，但不同抗寒能力的材料之间有一定差异，且不同长度的的测序频率不同。许多研究表明，sRNA 在不同物种间的长度分布会有所区别，如拟南芥(Pasquinelli et al., 2000)、小麦(Meng et al., 2013)、棉花(Sripathi et al., 2014)的 sRNA 长度最多分布在 24 nt，杨树(李明娜等, 2014)、大豆(Turner et al., 2012)和番茄(Pilcher et al., 2007)的 sRNA 长度最多分布在 21 nt，这些结果与我们的研究结果高度相似。我们通过生物信息学手段共挖掘 137 个 miRNA 在低温胁迫前后进行差异性表达，其中 100 个已知 miRNA (61 个上调，39 个下调)，37 个新 miRNA(15 个上调, 22 个下调)。许多研究表明，在低温胁迫下植物通过调节 miRNA 的表达水平，进而调节对应靶基因的表达，从而引起相关代谢与信号转导途径的变化来实现对逆境的响应，其信号转导途径主要包括胞外信号途径、胞内第二信使、转录因子以及功能基因等。Wu & Poethig (2006)的研究发现，低温胁迫导致 miR156 下调而其靶基因表达量增加，进而调控拟南芥营养期延长、生长代谢变缓，以应对不良环境，这与本研究低温胁迫后 miR156 下调的结果一致。王丽丽等(2017)分析在拟南芥、小麦和水稻研究中发现 miR160 响应低温胁迫。本研究中，在低温胁迫后 miR160g-1 表达下调，靶基因表达受抑制且作用于生长素信号通路从而在抵抗低温中发挥作用。Pourcel et al. (2005)研究表明 miR397 的靶基因与漆酶有关，与细胞壁木质素的合成、抗病、对环境的适应过程密切相关。而我们的研究发现低温胁迫后甘蔗叶片 miR397a-3 呈上调表达，其靶基因与抗坏血酸氧化酶（L-ascorbate oxidase）有关，可能参与调控抗坏血酸氧化酶的

表达而增强低温响应能力。Li et al. (2014)研究旱芹 miRNAs 对低温胁迫的响应，发现 miR160、miR164、miR394、miR395 和 miR408 具有表达差异。Sunkar & Zhu (2004)在研究分析拟南芥响应胁迫 miRNAs 中，发现一些 miRNA 能被多种胁迫因素诱导，如 miR393 受到低温、干旱、高盐的诱导表达。Gupta et al. (2014)研究小麦 miRNAs 对低温胁迫、盐胁迫、渗透胁迫的响应，发现在盐胁迫和低温胁迫下，miR168、miR397 均表达下调，而 miR172 表达上调；miR393 在渗透和盐胁迫下表达量上升，在低温胁迫下表达量下降。Sun et al.(2015) 研究发现，在低温胁迫下对葡萄的 miR169 的表达量上调，但在拟南芥、扁桃中研究发现 miR169 的表达量下调。结合前人的研究结果，我们认为特定 miRNAs 对低温胁迫的响应可能因植物种类、同一植物的不同基因型、不同的组织类型、胁迫的时间等而有所差异。

本研究利用 psRNATarget、TargetFinder 及 Tapirhybrid 三种分析方式预测靶基因，对预测所得的靶基因进行 GO 分析，发现在生物过程类别中预测靶基因的主要生物学功能富集于细胞过程和代谢过程；在细胞组分类别中预测靶基因生物学功能主要富集于细胞、细胞器和生物膜；在分子功能类别中预测靶基因生物学功能主要富集于结合和催化活性及转运活性。在逆境胁迫条件下植物通过调节 miRNA 的表达水平，进而调节对应靶基因的表达，从而引起相关代谢与信号转导途径的变化来实现对逆境的响应。因此，进一步对参与调控植物激素信号传导、光合色素合成、抗氧化酶系统、泛素介导蛋白水解、淀粉与蔗糖代谢等通路的靶基因进行 qRT-PCR 检验。本研究发现，miR156

靶向调控 SBP 转录因子，低温胁迫前后，miR156 下调表达，负向调控 SBP 转录因子，使甘蔗生长代谢变缓而耐寒能力增强。梅琳(2007)研究冬小麦发现，低温胁迫下 miR160 的靶基因 ARF17 在过表达 miR160f 拟南芥植株中表达量也明显下降。在拟南芥、水稻、玉米研究中也证明 miR160、miR167 的靶基因是 *ARF*(Auxin response factors) ，主要通过调控生长素信号通路应对逆境。而我们的研究也发现甘蔗在低温胁迫后 miR160g-1 上调表达且其作用于转录因子 ARF。张译云等(2012)研究发现毛白杨在低温胁迫下 miR169ac 表达下调，对其靶基因转录因子 NAC 负向调控。党春艳(2013)在研究高山离子芥低温胁迫响应中，发现 miR169a 在冷胁迫下无显著表达，而 miR169 在冷胁迫下表达下调，表明 miR169 家族之间响应低温存在差异。本研究中 miR169 a-3p_3 在低温胁迫后表达上调，作用于细胞核转录因子使其表达下调，推测 miR169 a-3p_3 与调控甘蔗低温耐受能力密切相关。

此外，本研究通过生物信息学挖掘甘蔗响应低温 miRNAs，不仅参与抗氧化酶系统、植物激素信号传导、遗传信息等，还发现参与类胡萝卜素代谢、卟啉与叶绿素代谢、淀粉与蔗糖代谢途径相关基因的表达。有研究表明叶绿体内的类胡萝卜素既可以作为吸收光能的辅助色素将能量传递给叶绿素 a，又可在持续胁迫条件下将过剩光能安全耗散而保护光合机构(Barbara et al., 1996; Liu et al., 2004; Holt et al., 2005)。我们前期的研究也发现低温胁迫时甘蔗能够通过增加光合机构过剩激发能的耗散和调整其叶片光合色素含量与构成进行有效的光能利用和分配。而且本研究对部分差异表达 miRNAs 及其靶基因进

行 qRT-PCR 检验，发现参与类胡萝卜素代谢的 miR167d 对靶基因具有负向调控作用。因此，后续我们对低温条件下参与光合生理过程的 miRNAs 进行深入研究其分子调控机制，为抗寒育种提供重要理论依据和实验基础。

参考文献:

AMBROS V. 2004. The function of animal MicroRNAs[J]. Nature, 431: 350-55.

BONNET E, HE Y, BILLIAU K, et al. ,2010. TAPIR, a web server for the prediction of plant microRNA targets, including target mimics[J]. Bioinformatics, 26: 1566-1568.

DANG YC. 2013. Expression anaysis of chilling-stress regulated miRNAs and their targets in Chorispora bungeana [J]. Lanzhou: Lanzhou University.[党春艳. 2013. 高山离子芥低温胁迫调控的 miRNAs 及其靶基因的表达分析[D]. 兰州: 兰州大学.]

DEMMIG-ADAMS B, ADAMS WW. 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis[J]. Trends Plant Sci, 1: 21-26.

EVERS M, MICHAEL H, DUECK A, et al.， 2015. miRA: adaptable novel miRNA identification in plants using small RNA sequencing data[J]. Bmc Bioinform, 16: 370.

FAHLGREN N, CARRINGTON JC. 2010. miRNA target prediction in plants[J]. Meth Mol B, 592: 51-57.

FRIEDLANDER MR, CHEN W, ADAMIDI C, et al.， 2008. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep[J]. Nat Biotechnol, 26:407–415.

GU L, HUANG ZG, LI WB, et al.， 2011. Analysis on climatic factors affecting sugarcane meteorological yield in Nanning area during 1980-2007 [J]. J S Agric, 42(5): 492-95.[古丽, 黄智刚, 李文宝, 等. 2011. 1980—2007 年南宁蔗区甘蔗气象产量变化及影响因子分析[J]. 南方农业学报, 42(5): 492-95.]

GUO T, LI GL, WEI Q, et al.， 2011. The function of plant MicroRNA [J]. Acta Bot Boreal-Occidental Sin, 31(11): 2237-2254.[郭韬, 李广林, 魏强, 等. 2011. 植物 MicroRNA 功能的研究进展[J]. 西北植物学报, 31(11): 2347-2254.]

GUPTA O, MEENA N, SHARMA I, et al.， 2014. Differential regulation of microRNAs in

response to osmotic, salt and cold stresses in wheat[J]. Mol Biol Rep, 41:4623–4629.

HE Y, TAN ZK, DING MH, et al.， 2008. Key meteorological factors controlling sugarcane yield and sucrose content in Guangxi [J]. J Anhui Agric Sci, 36(8): 3181-84.[何燕, 谭宗琨, 丁美花, 等. 2008. 制约广西甘蔗产量及蔗糖分含量的关键气象条件研究[J]. 安徽农业科学, 36(8): 3181-3184.]

HE Y, TAN ZK, DING MH, et al.，2009. Infrequent disaster of the cold and freezing disaster and its impacts on sugarcane production in Guangxi [J]. J Catastrophol, 24(1): 68-72.[何燕, 谭宗琨, 丁美花, 等. 2009. 2008 年罕见低温冻害对广西甘蔗及蔗糖业的影响[J]. 灾害学, 24(1): 68-72.]

HOLT NE, ZIGMANTAS D, VALKUNAS , et al.，2005. Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting[J]. Science, 307: 433-436.

KUANG ZM, LI Q , RAO YM, et al.，2009. Application of EOS/MODIS data to monitoring sugarcane cold damage [J]. J Appl Meteorol Sci, 20(3): 360-64.[匡昭敏, 李强, 尧永梅, 等. 2009. EOS/MODIS 数据在甘蔗寒害监测评估中的应用[J]. 应用气象学报, 20(3): 360-364.]

LI MH, LONG RC, YANG QC, et al.，2014. Cloning and function analysis of a salt-stress-induced HD-Zip transcription factor MsHB2 from Alfalfa [J]. Plant Physiol J, 47(4): 622-32.[李明娜, 龙瑞才, 杨青川, 等. 2014. 紫花苜蓿盐诱导 HD-Zip 类转录因子 MsHB2 的克隆及功能分析[J]. 中国农业科学, 47(4): 622-32.]

LI MY, WANG F, XU ZS,, et al.，2014. High throughput sequencing of two celery varieties small RNAs identifies microRNAs involved in temperature stress response[J]. Bmc Genom, 15: 242.

LI YR, FANG FX, WU JM, et al.， 2011. Survey of frost and cold damage on sugarcane production in Guangxi in 2010/2011 milling season and countermeasures [J]. J S Agric，42(1): 37-42.[李杨瑞, 方锋学, 吴建明, 等. 2011. 2010/2011 榨季广西甘蔗生产冻害调查及防御对策[J]. 南方农业学报, 42(1): 37-42.]

LIU YH, LIU ZZ, LUO LJ, et al.， 2007. Plant miRNA and its potential role in plant

developmental process and environmental stress responses [J]. Plant Physiol J: 987-992.[刘运华, 刘灶长, 罗利军. 2007. 植物 miRNA 及其在植物发育进程和环境胁迫响应中的潜在功能[J]. 植物生理学报.]

LIU Z, YAN H, WANG K, et al. ，2004. Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72|[thinsp]||[Aring]| resolution[J]. Nature, 428 (6980): 287.

LV, DE KANG, XI BAI, YONG LI, et al.， 2010. Profiling of cold-stress-responsive miRNAs in rice by microarrays[J]. Gene, 459: 39-47.

MEI L，2016. Cloning four kinds of MiRNAs and analysis of expression pattern with cold related in Triticum aestivum L. [D]. Northeast Agricultural University.[梅琳. 2016. 冬小麦抗寒相关 4 种 miRNAs 的克隆及表达特征分析[D]. 东北农业大学.]

MENG F, LIU H, WANG K, et al.， 2013. Development-associated microRNAs in grains of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Bmc Plant Biol, 13:140.

MORTAZAVI A, WILLIAMS BA, MCCUE K, et al.， 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. Nat methods, 5:621-628.

PASQUINELLI AE, REINHART BJ, SLACK F, et al.， 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA[J]. Nature, 408 (6808): 86-89.

PILCHER RLR, MOXON S, PAKSERESHT N, et al.， 2007. Identification of novel small RNAs in tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. Planta, 226: 709-17.

POURCEL L, ROUTABOUL JM, KERHOAS L, et al.， 2005. Transparent TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat[J]. Plant Cell, 17: 2966-80.

SRIPATHI, VR, CHOI Y, CHAN AP, et al.， 2014. Small RNA transcriptome profiles of four cotton species, *Gossypium hirsutum*, *G. herbaceum*, *G. arboreum* and *G. raimondii*[C]. SanDiego: International Plant and Animal Genome Conference XXII.

SU YX, LI Z, SUN H. 2006. Climate division of sugarcane planting based on GIS in Guangxi [J]. Chin J Agrometeorol, (3): 987-992.苏永秀, 李政, 孙涵. 2006. 基于 GIS 的广西甘蔗种植气候区划[J]. 中国农业气象, (3): 252-255+59.

SUN X, FAN G, SU L, et al.， 2015. Identification of cold-inducible microRNAs in grapevine[J].

Front Plant Sci, 6: 595.

SUNKAR R, CHINNUSAMY V, ZHU J, et al., 2007. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation[J]. Trends Plant Sci, 12: 301-309.

SUNKAR R, GIRKE G, JAIN PK, et al., 2005. Cloning and characterization of microRNAs from rice[J]. The Plant Cell Online, 17: 1397-1411.

SUNKAR R, LI YF, JAGADEESWARAN G. 2012. Functions of microRNAs in plant stress responses[J]. Trends Plant sci, 17: 196-203.

SUNKAR R, ZHU JK. 2004. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis[J]. Plant Cell Online, 16: 2001-2019.

THIEBAUT F, ROJAS CA, ALMEIDA KL, et al., 2012. Regulation of miR319 during cold stress in sugarcane[J]. Plant Cell Environ, 35: 502-512.

TURNER M, YU O, SUBRAMANIAN S. 2012. Genome organization and characteristics of soybean microRNAs[J]. Bmc Genom, 13: 169.

WANG LL, ZHAO TL, GE JT, et al., 2017. Application prospects of plant cold-stress-responsive miRNAs in cold resistance research of plants [J]. Acta Agric Shanghai, 33(6): 129-134.[王丽丽, 赵统利, 葛金涛, 等. 2017. 植物低温胁迫响应 miRNAs 在植物抗寒研究中的应用前景[J]. 上海农业学报, 33(6): 129-134.]

WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M, et al., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. Nat Rev Genet,10:57-63.

WANG X, TONG Y, WANG S. 2010. Rapid and accurate detection of plant miRNAs by liquid northern hybridization[J]. Int J Mol Sci, 11: 3138-3148.

WU G, POETHIG RS. 2006. Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3[J]. Development, 133: 3539-47.

WU HJ, MA YK, TONG C, et al., 2012. PsRobot: a web-based plant small RNA meta-analysis toolbox[J]. Nucl Acid Res, 40: 22-28.

WU MG, LIN YQ, ZHANG H. 2010. Research status and prospect on industrial standard of sugarcane in China[J]. Subtrop Agric Res, 6: 209-212.[吴棉国, 林彦铨, 张华. 2010. 我国甘蔗产业标准研究现状与展望[J]. 亚热带农业研究, 6: 209-212.]

XIONG L, ZHU JK. 2003. Regulation of abscisic acid biosynthesis[J]. Plant Physiol, 133: 29-36.

ZHANG YY, REN YY, CHEN L, et al., 2017. Differential expression analysis of 12 MicroRNAs under cold stress in *Populus tomentosa* [J]. Chin Agric Sci Bull, 28(7): 1-7.[张译云, 任媛媛, 陈磊, 等. 2012. 毛白杨 12 种 microRNAs 的低温胁迫差异表达分析[J]. 中国农学通

报, 28(7): 1-7.]